

بررسی الگوی متیلاسیون پروموتور ژن PTEN در بیماران مستعد ترمبوز (Hyper coagulable state) با روش

PCR اختصاصی متیلاسیون

دکتر مهدی آزاد، دکتر مهدی سهامانی

چکیده:

سیستم انعقاد خون یکی از مهمترین و کاربردی ترین سیستم های بدن است که به طور کلی از دو شاخه فاکتورهای انعقادی در مسیر های داخلی و خارجی و سیستم فیبرینولیز تشکیل شده است. مهار کنندگان سیستم انعقادی در نهایت منجر به توقف مراحل انعقادی میشوند. هرگونه برهم ریختن و از بین رفتن تعادل بین سیستم های انعقادی منجر به ترومبوز عروق در گردش خون گردد و در نهایت شرایطی را ایجاد کند که آمبولی عروق صورت گیرد (hypercoagulable state). همچنین در اثر بالا رفتن بیش از حد میزان فاکتورها منجر به ایجاد شرایطی تحت عنوان ترومبو آمبولیزم میشود. دلایل مختلفی میتواند منجر به HS شود: از جمله شرایط ژنتیکی آن میتوان به نقص در هر یک از فاکتورهای انعقادی بویژه فاکتورهای مشترک ۵ و ۲ و همچنین موتاسیون در ژن های کد کننده ی پروتئین های C و S اشاره نمود. همچنین میتوان از ریسک فاکتور های اکتسابی در ایجاد HS به چاقی، دیابت، ترومبوز و بارداری اشاره نمود. برخی بیماری ها مانند سندرم آنتی فسفولیپید نیز در ایجاد شرایط HS نقش دارند.

برخی از عوامل مهم در ایجاد HS

عملکرد پروتئین C: یک پروتئین وابسته به ویتامین K است که بواسطه ترومبین فعال شده و در انعقاد نقش دارد. در مورد تایپ ۱ بیش از ۱۰۰ نوع موتاسیون مشاهده شده است که موجب کاهش سطح فعالیت و همچنین کاهش سطح آنتی ژن می گردد. در تایپ ۲ کاهش فعالیت با سطح نرمالی از آنتی ژن مشاهده می گردد. تفاوت خاصی بین افرادی که علائم را بروز می دهند و آنهایی که بروز نمی دهند مشاهده نشده است. در کمبود هموزیگوت پروتئین C (کمتر از ۱٪ فعالیت)، علائم عصبی به همراه عوارض چشمی در دوره داخل رحمی دیده می شود و در دوره پس از تولد پورپورای شدید و انعقاد داخل عروقی منتشره DIC مشاهده شده است. این نقص مغایر با زندگی است مگر اینکه با جایگزین پروتئین C (مثل FFP یا کنسانتره پروتئین C) درمان شود. وراثت این پروتئین اتوزومال است. پروتئین S بعنوان کوفاکتور این پروتئین در نظر گرفته میشود و معمولا برای ارزیابی آنها از روش های سنجش آنتی ژن استفاده میکنند.

کاهش سطح آنتی ترومبین: آنتی ترومبین III مهارکننده ی فیزیولوژیک سیستم انعقادی خون و از خانواده سرین پروتئازها است. این مهار کننده فعالیت مهاری بر علیه فاکتورهای XIIa, Xa, IXa است. فعالیت ضد انعقادی آنتی ترومبین در حضور آنتی ترومبین به مقدار زیادی افزایش می یابد. در دوران اولیه تولد سطح پایینی دارد و در ۶ ماهگی به حداکثر می رسد. نقص این پروتئین را هم در شرایط اکتسابی و هم در شرایط ارثی شاهد هستیم اما نوع ژنتیکی کمبود آن نادر می باشد. بیماری اتوزومال و غالب است. جهش در ژن این پروتئین زیاد رخ می دهد. افراد هتروزیگوت دارای سطح پلاسمایی آنتی ترومبین در حدود ۵۰٪ افراد نرمال هستند. نوع هموزیگوت مغایر با حیات است. سنجش سطح آنتی ژنی آنتی ترومبین با نفلومتري يا enzyme linked immuno sorbent assay انجام میگردد.

پروترومبین ۲۰۲۱۰: یک پلی مورفیسم در باز شماره ۲۰۲۱۰ می باشد که گوانین با آدنین در سمت 3' UTR ژن تعویض می گردد. نوع هتروزیگوت این پلی مورفیسم موجب افزایش ۲ برابری خطر ابتلا به ترمبوز می گردد.

اگر سطح فاکتورهای ۷ و ۸ و ۹ و ۱۰ یا فیبرینوژن بالا رود شانس بروز ترمبوز عروقی به طور نسبی بالا می رود. از این میان فاکتور ۸ بیشتر مورد بررسی قرار گرفته است و از همه پیچیده تر است. فاکتور ۸ به وسیله مکانیزم های ژنتیکی و فیزیولوژی تنظیم می شود که باعث رها سازی آن از ذخائر خود در زمان استرس یا ورزش می گردد. سطح بالای این فاکتور در بیماران با سطح بالایی از فاکتور وان ویلبراند نیز دیده می شود.

کمبود ویتامین k: سطح ناکافی این ویتامین منجر به اختلال در سنتز فاکتورهای انعقادی IX, VII, X و II میگردد و به تبع این اختلال مشکلات عمده ای برای این افراد از جمله HS پدید می آید.

از طرف دیگر نقش تغییرات ساختاری ژنتیکی (شامل SNP، ترانسلوکاسیون ها، جهش های درجی، حذفی، حذف کروموزومی و ...) در بسیاری از ژن های دخیل در فرایندهای سیگنالینگ سلولی، پیشبرد چرخه سلولی، تکثیر، تمایز، آپوپتوز و فاکتورهای رونویسی و نقش کلی آنها در پاتورنز بیماری های انعقادی ثابت شده است. مطالعات گسترده ای نقش عوامل اپی ژنتیکی مانند متیلاسیون DNA استیلایسیون و فسفریلاسیون در فرآیند HS بررسی نموده اند. امروزه شواهد کافی برای اثبات نقش عوامل اپی ژنتیک در تنظیم بیان ژن های مهارگر تومور، انکوژن ها و دیگر ژن های دخیل در توموریزشن وجود دارد. الگوهای اپی ژنتیکی، حالت های قابل توارثی هستند که می توانند بدون ایجاد تغییر در ساختار نوکلئوتیدی DNA باعث سرکوب یا بروز یک ژن خاص شوند. از آنجا که علیرغم تغییرات ساختاری، تغییر در بیان ژن ناشی از این عوامل برگشت پذیر می باشد، مطالعات زیادی تمرکز خود را بر ایجاد تغییرات اپی ژنتیک در راستای افزایش بیان ژن های مهارگر تومور یا خاموش کردن ژن های آغازگر تومور قرار داده اند.

یکی از مهمترین مطالعات انجام شده، تحقیقات بر روی اثرات داروهای دمتیله بر روی پروموتور ژن های مختلف از جمله ژن های کدکننده ی فاکتورهای انعقادی است. در حقیقت پروتئین های MBD از طریق اتصال به دومین های CPG در DNA متیل بر روی بیان ژن اثر میگذارند. این DNAها همچنین از طریق د استیلازهای هیستونی عمل رونویسی را مهار میکنند.

PTEN یک ژن سرکوب کننده ی تومور میباشد که بر روی کروموزوم 10q23 قرار دارد. از بین رفتن این ژن در تومورهای آندومتریال، پروستات، سینه، مغز نیز شناسایی شده است. در حقیقت موتاسیون این ژن در ابتدایی ترین ایجاد سرطان آندومتر قرار دارد. این ژن یک نقش مهم در مرگ سلولی و آپوپتوز دارد. همچنین در مهاجرت و تمایز سلولی دخالت دارد و از طریق مهار PIP3 سبب کاهش پرولیفراسیون سلولی میشود. به نظر میرسد طی مطالعات انجام شده ارتباط معناداری بین بیان ژن PTEN و بیماری های مختلف وجود داشته باشد. در سال ۲۰۰۰ دکتر روس در مقاله خود که بر روی ۱۵۲ نمونه از خون خانم ها با میانگین سنی ۶۲ سال انجام داد، به این نتیجه رسید که PTEN بعنوان یک Tumor Suppressor عمل میکند. در این مطالعه سعی میکنیم به بررسی اثر متیلاسیون پروموتور ژن PTEN در HS بپردازیم. از عملکردهای شناخته شده دیگر این ژن میتوان به کنترل منفی روی مسیر P13 کیناز اشاره نمود. همچنین این ژن بعنوان یک مهارکننده ی تومور شناخته میشود. متیلاسیون PTEN در تومورهای مختلفی از جمله سرطان رحم دیده میشود.

سلول های سرطانی در مقایسه با سلول های سالم اختلال بیشتری در الگوی متیلاسیون DNA خود نشان می دهند. تا کنون در بسیاری از کنسر ها افزایش متیلاسیون در ژن های مختلف سرکوبگر تومور گزارش شده است. این ژن ها می توانند ژن های دخیل در چرخه سلولی (مثل p14ARF, Rb, p15INK4a, p16INK4a)، ژن های مرتبط با تعمیر DNA (MGMT) و BRCA1)، آپوپتوز (TMS1, DAPK)، ژن های مقاومت دارویی، تمایز، آنژیوژنز، و متاستاز باشند. در تحقیقات انجام شده روی متیلاسیون پروموتور ژن PTEN در سندرم های متابولیک (MeS) که یکی از ریسک فاکتورهای ابتلا به دیابت نوع ۲ (T2D) است، مشخص شده که در بیماران مبتلا به سندرم های متابولیک هایپر متیلاسیون کمتری نسبت به افراد سالم دیده می شود از اینرو الگوی متیلاسیون پروموتور PTEN در این دسته از بیماران می تواند به عنوان یک فاکتور حفاظتی در برابر ابتلا به سندرم های متابولیک مطرح باشد

تا پیش از این مطالعه جامعی در مورد ارتباط میان متیلاسیون PTEN و افراد HS صورت نگرفته است. در این تحقیق در نظر داریم تا با آشکارسازی الگوی متیلاسیون در PTEN به روش MSP گامی در راستای بهبود وضعیت این بیماران برداریم.